



Bir hitam (*Stout*)



© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Komposisi	1
5 Syarat mutu	2
6 Pengambilan contoh	2
7 Cara uji	3
8 Syarat lulus uji	3
9 Higiene.....	3
10 Pengemasan.....	3
11 Penandaan	3
Lampiran A	4
Bibliografi	38

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Bir hitam (Stout)* ini merupakan revisi dari SNI 01-3774-1995, *Bir hitam (Stout)*. Standar ini direvisi dan dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut:

- Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam metode uji dan persyaratan mutu;
- Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku;
- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan olahan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Mendukung perkembangan produk industri bir.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan ketentuan pada :

1. Undang-Undang Republik Indonesia No. 5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
2. Undang-Undang Republik Indonesia No. 7 Tahun 1996 tentang Pangan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
4. Undang-Undang Republik Indonesia No. 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
5. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan.
7. Keputusan Presiden Republik Indonesia No. 3/1997 tentang Pengawasan dan Pengendalian Minuman Beralkohol.
8. Peraturan Menteri Perindustrian dan Perdagangan Republik Indonesia No.359/MPP/Kep/10/1997 Tentang Pengawasan dan Pengendalian Produksi, Impor, Pengedaran dan Penjualan Minuman Beralkohol.
9. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia No.75/M-IND/PER/7/2010 tentang Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.
10. Peraturan Menteri Perdagangan Republik Indonesia No.15/M-DAG/PER/3/2006 Tentang Pengawasan dan Pengendalian Impor, Pengedaran dan Penjualan, dan Perizinan Minuman Beralkohol.
11. Peraturan Direktur Jenderal Industri Agro No.30/IA/Per/12/2011, tentang Petunjuk Teknis Penilaian Penerapan Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.
12. Surat Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
13. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Makanan.
14. Peraturan Menteri Perdagangan Republik Indonesia No.43/M-DAG/PER/9/2009 Tentang Ketentuan Pengadaan, Pengedaran, Penjualan, Pengawasan dan Pengendalian Minuman Beralkohol.
15. Peraturan Menteri Perdagangan Republik Indonesia No.53/M-DAG/PER/12/2010 tentang Perubahan atas Peraturan Menteri Perdagangan Republik Indonesia No.43/M-DAG/PER/9/2009 tentang Ketentuan Pengadaan, Pengedaran, Penjualan, Pengawasan dan Pengendalian Minuman Beralkohol.

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis 67-04-S1, *Minuman dan Tembakau*, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 13 Desember 2011 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 13 Juli 2012 sampai dengan tanggal 12 Oktober 2012 dengan hasil akhir RASNI.



Bir hitam (*Stout*)

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu, pengambilan contoh, cara uji, pengemasan dan penandaan bir hitam (*stout*).

2 Acuan normatif

Untuk acuan normatif tidak bertanggal, edisi terakhir yang digunakan (termasuk revisi dan amandemennya).

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

3 Istilah dan definisi

3.1

bir hitam (*stout*)

minuman hasil fermentasi khamir yang mengapung (*top fermented yeast*) dari *malt* dan biji *barley* (*Hordeum vulgare*) yang disangrai dan ditambahkan *hops* (*Lupuli glandulae*) dengan aroma *hops* yang kuat, berwarna hitam kecoklatan, dengan atau tanpa bahan pangan lain dan atau bahan tambahan pangan yang diizinkan sesuai ketentuan yang berlaku

3.2

malt

biji *barley* yang telah mengalami proses perkecambahan dan pengeringan

4 Komposisi

4.1 Bahan baku

Air, malt, biji *barley* yang disangrai dan *hops*.

4.2 Bahan pangan lain

Bahan pangan yang diizinkan untuk bir hitam (*stout*).

4.3 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk bir hitam (*stout*) sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

5 Syarat mutu

Syarat mutu bir hitam (*stout*) sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 – Syarat mutu bir hitam (*stout*)

No	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan:		
1.1	Bau	-	normal
1.2	Warna	-	hitam kecoklatan
1.3	Rasa	-	normal
2	pH	-	3-5
3	Etanol	% (v/v)	2 - 8
4	Metanol	% (v/v)	< 0,01
5	Kepahitan (<i>bitterness</i>)	EBU	min. 16
6	CO ₂	% (b/b)	min. 0,46
7	Sari (ekstrak asal)	% (b/b)	min. 10
8	Cemaran logam		
8.1	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 0,2
8.2	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,2
8.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40,0 maks. 250,0*
8.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,03
9	Cemaran Arsen (As)	mg/kg	maks. 0,2
10	Cemaran mikroba		
10.1	Angka Lempeng Total (ALT)	Koloni/mL	maks. 1 x 10 ⁴
10.2	Bakteri <i>Coliform</i>	APM/mL	< 3
10.3	<i>Salmonella sp.</i>	-	negatif / 25 mL
10.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	negatif / mL
CATATAN:			
* untuk produk yang dikemas dalam kaleng			

6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.

7 Cara uji

Cara uji untuk bir hitam (*stout*) seperti di bawah ini:

- a) Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- b) Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
 - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
 - Cara uji warna sesuai Lampiran A.2.2
 - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.3
- c) Cara uji pH sesuai Lampiran A.3
- d) Cara uji etanol sesuai Lampiran A.4
 - Cara uji etanol metoda berat jenis sesuai Lampiran A.4.1
 - Cara uji etanol metoda kromatografi gas sesuai Lampiran A.4.2
- e) Cara uji metanol sesuai Lampiran A.5
- f) Cara uji kepahitan (*bitterness*) sesuai Lampiran A.6
- g) Cara uji CO₂ sesuai Lampiran A.7
- h) Cara uji sari (ekstrak asal) sesuai Lampiran A.8
- i) Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.9
 - Cara uji kadmium (Cd) dan timbal (Pb) sesuai Lampiran A.9.1
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.9.2
 - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.9.3
- j) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.10
- k) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.11
 - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran A.11.1
 - Cara uji Angka Lempeng Total sesuai Lampiran A.11.2
 - Cara uji Bakteri *Coliform* sesuai Lampiran A.11.3
 - Cara uji *Salmonella sp* sesuai Lampiran A.11.4
 - Cara uji *Staphylococcus aureus* sesuai Lampiran A.11.5

8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Tabel 1.

9 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

10 Pengemasan

Bir hitam (*stout*) dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

11 Penandaan

Penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.

Lampiran A
(normatif)
Cara uji bir hitam (*stout*)

A.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji organoleptik dan analisis kimia.

A.1.1 Persiapan contoh untuk uji organoleptik

Buka kemasan bir hitam dan ambil contoh bir hitam.

A.1.2 Persiapan contoh untuk uji kimia

Buka kemasan bir hitam dan ambil contoh bir hitam sebanyak 400 mL kemudian tempatkan dalam botol Erlenmeyer yang bersih dan kering.

A.2 Keadaan**A.2.1 Bau****A.2.1.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.1.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.2 Warna**A.2.2.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penglihatan yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.2.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) lihat contoh uji untuk mengetahui warnanya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

Catat warna yang terlihat.

A.2.3 Rasa

A.2.3.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.3.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan rasakan dengan indera pengecap (lidah); dan
- b) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.3 pH

A.3.1 Prinsip

Metode pengukuran pH secara elektrometri berdasarkan pengukuran aktivitas ion hidrogen dengan menggunakan metode pengukuran secara potensiometri dengan elektroda gelas hidrogen sebagai standar primer dan elektroda kalomel atom perak klorida sebagai pembanding.

A.3.2 Peralatan

- a) pH meter;
- b) Elektroda gelas;
- c) Elektroda pembanding;
- d) Pengaduk magnetik; dan
- e) Gelas piala 250 mL.

A.3.3 Pereaksi

- a) Larutan standar pH
 - Larutan bufer pH 4
 - Larutan bufer pH 7
 - Larutan bufer pH 9
- b) Air suling

A.3.4 Cara kerja

- a) Kalibrasi pH meter dengan larutan bufer setiap kali akan melakukan pengukuran;
- b) celupkan elektroda yang telah dibersihkan dengan air suling ke dalam contoh yang akan diukur pH-nya;
- c) baca dan catat nilai pH.

A.4 Etanol

A.4.1 Metoda Berat Jenis

A.4.1.1 Prinsip

Membandingkan volume destilat sampel dan air pada suhu 20 °C untuk mengetahui berat jenisnya. Dari daftar berat jenis yang ada dalam tabel, akan didapatkan kadar etanol yang terkandung dalam contoh.

A.4.1.2 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg ;
- Piknometer;
- Pendingin tegak;
- Labu destilasi;
- Pemanas listrik;
- Pipet volumetrik berukuran 100 mL terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mL

A.4.1.3 Pereaksi

- Air suling

A.4.1.4 Cara kerja

- Pipet 100 mL contoh bir hitam ke dalam labu destilasi 300 mL - 500 mL;
- tambahkan 50 mL air suling dan destilasi;
- tampung destilatnya ke dalam piknometer (yang sudah diketahui bobotnya) sampai tanda garis;
- dinginkan piknometer pada suhu 20 °C selama ± 15 menit;
- tepatkan volumenya pada garis tanda;
- biarkan sampai suhu kamar, bersihkan dengan kertas saring dan timbang;
- timbang juga piknometer yang sama dengan berisi air suling pada suhu 20 °C (sebagai pembanding); dan
- hitung berat jenis alkohol (20/20 °C) dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{BJ alkohol (20/20 °C)} = \frac{\text{Berat alkohol (destilasi) pada 20 °C}}{\text{Berat air pada 20 °C}}$$

A.4.1.5 Perhitungan

Kadar etanol dapat dihitung dengan melihat Tabel A.1

Tabel A.1 – Hubungan antara kadar alkohol (% isi) pada 15,56 °C dengan berat jenis pada berbagai suhu

Berat Jenis	15.56 15.56	20/20	22/22	24/24	25/25	26/26	28/28	30/30	32/32	34/34	35/35	36/36
1.0000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.9999	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
98	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13
97	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.20
96	.27	.26	.26	.26	.26	.26	.26	.26	.26	.26	.26	.26
95	.33	.33	.33	.33	.33	.33	.33	.33	.33	.33	.33	.33
94	.40	.40	.40	.40	.40	.40	.40	.40	.40	.40	.40	.40
93	.47	.46	.46	.46	.46	.46	.46	.46	.46	.46	.46	.46
92	.53	.53	.53	.53	.53	.53	.53	.53	.53	.53	.53	.53
91	.60	.60	.60	.60	.60	.60	.60	.60	.60	.60	.60	.60
90	.67	.66	.66	.66	.66	.66	.66	.66	.66	.66	.66	.66
89	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73
88	.80	.80	.80	.80	.80	.80	.79	.79	.79	.79	.79	.79
87	.87	.87	.87	.87	.87	.87	.86	.86	.86	.86	.86	.86
86	.93	.93	.93	.93	.93	.93	.93	.93	.93	.93	.93	.93
85	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.99	.99	.99	.99	.99	.99
84	.07	.07	.07	.07	.07	.07	1.06	1.06	1.06	1.06	1.06	1.06
83	.14	.14	.14	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13
82	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.19	.19	.19	.19	.19
81	.27	.27	.27	.27	.27	.27	.26	.26	.26	.26	.26	.26
80	.34	.34	.34	.34	.34	.33	.33	.32	.32	.32	.32	.32
79	.41	.41	.41	.40	.40	.40	.40	.39	.39	.39	.39	.39
78	.48	.48	.48	.47	.47	.47	.47	.46	.46	.46	.46	.46
77	.54	.54	.54	.54	.54	.53	.53	.53	.53	.53	.52	.52
76	.61	.61	.61	.60	.60	.60	.60	.59	.59	.59	.59	.59
75	.68	.68	.68	.67	.67	.67	.67	.66	.66	.66	.66	.66
74	.75	.75	.75	.74	.74	.73	.73	.73	.73	.72	.72	.72
73	.82	.81	.81	.81	.81	.80	.80	.80	.80	.79	.79	.79
72	.88	.88	.88	.87	.87	.87	.86	.86	.86	.85	.85	.85
71	.95	.95	.95	.94	.94	.94	.93	.93	.93	.92	.92	.92
70	2.02	2.02	2.02	2.01	2.01	2.01	2.00	2.00	2.00	.99	.99	.99
69	.09	.09	.09	.08	.08	.08	.07	.07	.06	2.05	2.05	2.05
68	.16	.15	.15	.14	.14	.14	.14	.14	.13	.12	.12	.12
67	.23	.22	.22	.21	.21	.21	.20	.20	.20	.19	.19	.19
66	.30	.29	.29	.28	.28	.28	.27	.27	.27	.26	.26	.26
65	.37	.36	.36	.35	.35	.35	.34	.34	.33	.32	.32	.32
64	.43	.43	.43	.42	.42	.42	.41	.41	.40	.39	.39	.39
63	.50	.50	.50	.49	.49	.49	.48	.48	.47	.46	.46	.46
62	.57	.57	.57	.56	.56	.56	.55	.54	.54	.53	.53	.53
61	.64	.64	.64	.63	.63	.63	.62	.61	.60	.60	.59	.59
60	.71	.70	.70	.70	.70	.70	.69	.68	.67	.67	.66	.66
59	.78	.77	.77	.77	.77	.77	.76	.75	.74	.74	.73	.73
58	.85	.84	.84	.83	.83	.83	.82	.82	.81	.81	.80	.80
57	.92	.91	.91	.90	.90	.90	.89	.88	.87	.87	.86	.86
56	.99	.98	.98	.97	.97	.97	.96	.95	.94	.94	.93	.93
55	3.06	3.05	3.05	3.04	3.04	3.04	3.03	3.02	3.01	3.01	3.00	3.00
54	.13	.12	.12	.11	.11	.11	.10	.09	.08	.08	.07	.07
53	.20	.19	.19	.18	.18	.18	.17	.16	.15	.15	.14	.14
52	.27	.26	.26	.25	.25	.25	.24	.23	.22	.22	.21	.21
51	.34	.33	.33	.32	.32	.32	.31	.30	.29	.28	.27	.27
50	.41	.40	.40	.39	.39	.39	.38	.37	.36	.35	.34	.34
49	.49	.47	.47	.46	.46	.46	.45	.44	.43	.42	.41	.41
48	.56	.54	.54	.53	.53	.53	.52	.51	.50	.49	.48	.48
47	.63	.61	.61	.60	.60	.60	.59	.58	.57	.56	.55	.55
46	.70	.68	.68	.67	.67	.67	.66	.65	.64	.63	.62	.62
45	.77	.76	.75	.74	.74	.74	.73	.72	.70	.69	.68	.68
44	.84	.83	.82	.81	.81	.81	.79	.78	.77	.76	.75	.75
43	.91	.90	.89	.88	.88	.88	.86	.85	.84	.83	.82	.82
42	.99	.97	.96	.95	.95	.95	.93	.92	.91	.90	.89	.89
41	4.06	4.04	4.03	4.02	4.02	4.02	4.00	.99	.98	.97	.96	.96
40	.13	.11	.10	.10	.09	.09	.07	4.06	4.05	4.04	4.03	4.03
39	.20	.18	.17	.17	.16	.16	.14	.13	.12	.11	.10	.10
38	.28	.26	.25	.25	.24	.23	.21	.20	.19	.18	.17	.17
37	.35	.33	.32	.32	.31	.30	.28	.27	.26	.25	.24	.24
36	.42	.40	.39	.39	.38	.37	.36	.35	.33	.32	.31	.30
35	.50	.48	.47	.46	.45	.44	.43	.42	.40	.39	.38	.37
34	.57	.55	.54	.53	.52	.51	.50	.49	.47	.46	.45	.44
33	.64	.62	.61	.60	.59	.58	.57	.56	.54	.53	.52	.51
32	.71	.69	.68	.67	.66	.65	.64	.63	.61	.60	.59	.58
31	.79	.77	.76	.75	.74	.73	.72	.70	.68	.67	.66	.65

Tabel A.1 – (lanjutan)

Berat Jenis	15.56 15.56	20/20	22/22	24/24	25/25	26/26	28/28	30/30	32/32	34/34	35/35	36/36
0.9930	4.86	4.84	4.83	4.82	4.81	4.80	4.79	4.77	4.75	4.74	4.73	4.72
29	.93	.91	.90	.89	.88	.87	.86	.84	.82	.81	.80	.79
28	5.01	.98	.97	.96	.95	.94	.93	.91	.89	.88	.87	.86
27	.08	5.06	5.04	5.03	5.02	5.01	5.00	.98	.96	.95	.94	.93
26	.16	.13	.12	.11	.10	.09	.07	5.05	5.03	5.02	5.01	5.00
25	.23	.21	.19	.18	.17	.16	.14	.12	.10	.09	.08	.07
24	.31	.28	.26	.25	.24	.23	.21	.20	.18	.16	.15	.14
23	.39	.36	.34	.33	.32	.31	.29	.27	.25	.23	.22	.21
22	.46	.43	.41	.40	.39	.38	.36	.34	.32	.30	.29	.28
21	.54	.51	.49	.48	.47	.46	.44	.42	.40	.38	.37	.36
20	.61	.58	.56	.55	.54	.53	.51	.49	.47	.45	.44	.43
19	.69	.66	.64	.62	.61	.60	.58	.56	.54	.52	.51	.50
18	.77	.73	.71	.70	.69	.68	.66	.64	.62	.59	.58	.57
17	.84	.81	.79	.77	.76	.75	.73	.71	.69	.66	.65	.64
16	.92	.88	.86	.85	.84	.83	.80	.78	.76	.74	.73	.72
15	.99	.96	.94	.92	.91	.90	.87	.85	.83	.81	.80	.79
14	6.07	6.03	6.01	6.00	.99	.98	.95	.93	.91	.88	.87	.86
13	.15	.11	.09	.07	6.06	6.05	6.02	6.00	.98	.95	.94	.93
12	.23	.18	.16	.15	.14	.13	.10	.08	6.05	6.02	6.01	6.00
11	.30	.26	.24	.22	.21	.20	.17	.15	.12	.10	.09	.08
10	.38	.34	.32	.30	.29	.28	.25	.23	.20	.17	.16	.15
09	.46	.41	.39	.37	.36	.35	.32	.30	.28	.25	.24	.23
08	.54	.49	.47	.45	.44	.43	.40	.38	.35	.32	.31	.30
07	.62	.57	.55	.53	.52	.51	.48	.45	.42	.39	.38	.37
06	.70	.65	.63	.60	.59	.58	.55	.53	.50	.47	.46	.45
05	.77	.73	.71	.68	.67	.66	.63	.60	.57	.54	.53	.52
04	.85	.80	.78	.75	.74	.73	.70	.68	.65	.62	.60	.59
03	.93	.88	.86	.83	.82	.81	.78	.75	.72	.69	.68	.67
02	7.01	.96	.93	.90	.89	.88	.85	.83	.80	.77	.75	.74
01	.09	7.04	7.01	.98	.97	.89	.92	.90	.87	.84	.82	.81
00	.17	.12	.09	7.06	7.05	7.03	7.00	.98	.94	.91	.90	.88
0.9899	.25	.19	.16	.13	.12	.10	.07	7.05	7.01	.98	.97	.99
98	.33	.27	.24	.21	.20	.18	.15	.13	.09	7.06	7.04	7.02
97	.41	.35	.32	.29	.28	.26	.23	.21	.17	.14	.12	.10
96	.50	.43	.40	.37	.36	.34	.31	.28	.24	.21	.19	.17
95	.58	.51	.48	.45	.44	.42	.39	.36	.32	.29	.27	.25
94	.66	.59	.56	.53	.52	.50	.47	.44	.40	.36	.34	.32
93	.74	.67	.64	.60	.59	.57	.54	.51	.47	.44	.42	.40
92	.82	.75	.72	.68	.67	.65	.62	.59	.55	.51	.49	.47
91	.90	.82	.79	.76	.75	.73	.70	.66	.62	.59	.57	.55
90	.98	.90	.87	.84	.83	.81	.78	.74	.70	.66	.64	.62
89	8.07	.98	.95	.92	.91	.89	.86	.82	.78	.74	.72	.70
88	.15	8.06	8.03	8.00	.98	.96	.93	.89	.85	.81	.79	.77
87	.23	.15	.11	.08	8.06	8.04	8.01	.97	.93	.89	.87	.85
86	.32	.23	.19	.16	.14	.12	.09	8.05	8.01	.96	.94	.92
85	.40	.31	.27	.24	.22	.20	.16	.12	.08	8.04	8.02	8.00
84	.48	.39	.35	.32	.30	.28	.24	.20	.16	.11	.09	.07
83	.57	.47	.43	.40	.38	.36	.32	.27	.23	.19	.17	.15
82	.65	.55	.51	.48	.46	.44	.40	.35	.31	.26	.24	.22
81	.73	.63	.59	.56	.54	.52	.48	.43	.39	.34	.32	.30
80	.82	.71	.67	.63	.61	.59	.55	.50	.46	.41	.39	.37
79	.90	.79	.75	.71	.69	.67	.63	.58	.54	.49	.47	.45
78	.98	.88	.84	.79	.77	.75	.71	.66	.61	.56	.54	.52
77	9.07	.96	.92	.87	.85	.83	.78	.73	.69	.64	.62	.60
76	.15	9.04	9.00	.95	.93	.91	.86	.81	.76	.71	.69	.67
75	.24	.13	.08	9.03	9.01	.99	.94	.89	.84	.79	.77	.75
74	.32	.21	.16	.11	.09	9.07	9.02	.96	.91	.86	.84	.82
73	.40	.29	.24	.19	.17	.15	.10	9.04	.99	.92	.92	.90
72	.49	.38	.33	.27	.25	.23	.18	.12	9.07	9.02	.99	.97
71	.57	.46	.41	.35	.33	.31	.26	.20	.15	.10	9.07	9.05
70	.66	.54	.49	.43	.41	.38	.33	.27	.22	.17	.14	.12
69	.74	.62	.57	.51	.49	.46	.41	.35	.30	.25	.22	.19
68	.82	.70	.65	.59	.57	.54	.49	.43	.37	.32	.29	.26
67	.91	.79	.74	.68	.65	.62	.57	.51	.45	.40	.37	.34
66	.99	.87	.82	.76	.73	.70	.65	.59	.53	.47	.44	.41
65	10.08	.95	.90	.84	.81	.78	.72	.66	.60	.54	.51	.48
64	.16	10.03	.98	.92	.89	.86	.80	.74	.68	.62	.59	.56
63	.25	.11	10.06	10.00	.97	.94	.88	.82	.76	.69	.66	.63
62	.33	.20	.14	.08	10.05	10.02	.96	.90	.84	.77	.74	.71
61	.42	.28	.22	.16	.13	.10	10.04	.98	.91	.84	.81	.78

A.4.2 Metoda Kromatografi Gas

A.4.2.1 Prinsip

Standar internal n-propanol ditambahkan ke dalam contoh, dan etanol ditetapkan menggunakan kromatografi gas dengan detektor *Flame Ionization Detector* (FID).

A.4.2.2 Peralatan

- a) Kromatografi gas yang dilengkapi dengan :
 - Detektor : *Flame Ionization Detector* (FID)
 - Kolom : *Stainless steel* atau gelas kaca berukuran 6 ft x 1/8 in, yang mengandung 80 mesh sampai dengan 100 mesh Chromosorb 103
 - Gas pembawa : Helium atau nitrogen dengan laju alir 20 mL/menit
 - Suhu injektor : 175 °C
 - Suhu kolom : 185 °C
 - Suhu detektor : 250 °C
- b) Pipet volumetrik berukuran 5 mL terkalibrasi dengan ketelitian 0,01 mL
- c) *Syringe*

A.4.2.3 Pereaksi

- a) Standar internal n-propanol 5 % dalam air dan disimpan dalam refrigerator;
- b) Larutan standar etanol 3,4,5,6,7, dan 8 % disimpan dalam refrigerator.

A.4.2.4 Kalibrasi

- a) Pipet 5,0 mL masing-masing larutan standar etanol dan masukkan ke dalam labu;
- b) tambahkan 5,0 mL larutan standar internal ke dalam masing-masing larutan standar etanol dan kocok dengan baik;
- c) injeksikan 0,2 µL dengan dua kali ulangan dari masing-masing larutan dan ukur tinggi puncak;
- d) hitung rasio etanol dengan puncak n-propanol dan rata-rata dari tiap konsentrasi; dan
- e) plot rasio terhadap konsentrasi dan hitung slop nya (F).

A.4.2.5 Cara kerja

- a) Saring contoh yang telah bebas CO₂;
- b) pipet 5,0 mL contoh ke dalam labu dan tambahkan 5,0 mL larutan standar internal;
- c) aduk dengan cara menggoyang labu; dan
- d) injeksikan 0,2 µL ke dalam kolom kromatografi gas dan tentukan rasio puncak etanol terhadap puncak n-propanol;

A.4.2.6 Perhitungan

$$\% \text{ Etanol (v/v)} = \frac{\text{tinggi puncak etanol} / \text{tinggi puncak n-propanol}}{F}$$

A.5 Metanol**A.5.1 Prinsip**

Metanol dioksidasi dengan kalium permanganat menjadi formaldehid. Kelebihan kalium permanganat direaksikan dengan natrium bisulfit, kemudian formaldehida yang terbentuk direaksikan dengan asam kromotropat atau garamnya. Warna yang timbul diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 575 nm.

A.5.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer UV-Vis terkalibrasi;

- b) Seperangkat alat destilasi;
- c) Penangas air;
- d) Penangas es;
- e) Labu ukur 50 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- f) Pipet volumetrik berukuran 1 mL, 2 mL, dan 25 mL terkalibrasi

A.5.3 Pereaksi

- a) Asam sulfat pekat, H_2SO_4
- b) Asam fosfat, H_3PO_4
- c) Natrium bisulfit;
- d) Larutan Kalium permanganat;
Larutkan 3,0 g KMnO_4 dan 15,0 mL H_3PO_4 dalam 100 mL H_2O . Larutan ini tahan sebulan
- e) Larutan natrium kromatropat (Natrium 1,8-dihidroksi-naftalena-3,6-disulfonat) 5 %. Saring jika tidak jernih. Larutan ini tahan seminggu. Jika absorbansi blanko menggunakan pereaksi ini $> 0,05$ maka pereaksi harus dimurnikan dengan cara sebagai berikut :
Larutkan 10 g asam kromatropat atau garamnya dalam 25 mL air (tambahkan 2 mL H_2SO_4 pada larutan dari garam untuk mengubahnya menjadi asam bebas). Tambahkan 50 mL metanol, panaskan hingga mencapai titik didihnya dan saring. Tambahkan 100 mL isopropanol untuk mengendapkan asam kromatropat bebas (tambahkan lebih banyak isopropanol untuk meningkatkan hasil asam yang dimurnikan).
- f) Larutan baku metanol
Buat larutan standar metanol 0,025 % v/v dalam alkohol 5,5%
Kalium permanganat, KMnO_4 3%

A.5.4 Cara kerja

- a) Persiapan contoh uji
 - Encerkan atau sesuaikan konsentrasi alkohol total larutan uji menjadi sekitar 5 % - 6 %;
 - dengan menggunakan 50 mL larutan uji yang telah diencerkan, distilasi dan kumpulkan distilatnya sebanyak 40 mL. Encerkan hingga 50 mL dengan H_2O (jika alkohol telah ditentukan sebelumnya, kadar alkohol distilat dapat disesuaikan hingga 5 % - 6 % dan digunakan untuk uji ini);
 - jika terdapat campuran $> 0,05$ %, encerkan hingga mencapai kadar tersebut menggunakan 5,5% alkohol; dan
 - untuk produk yang mengandung $< 0,05\%$ metanol, ukur 200 mL ke dalam wadah, tempatkan system dalam refluk total selama 15 menit dan secara perlahan distilasi pada laju refluk tinggi ($\geq 20:1$). Kumpulkan 10 mL distilat dan encerkan hingga 160 mL dengan H_2O .
- b) Penentuan kadar metanol
 - Pipet 2 mL larutan KMnO_4 ke dalam labu ukur 50 mL;
 - dinginkan dalam penangas es dan tambahkan 1mL distilat yang telah encerkan (butir A.5.4), dan diamkan selama 30 menit dalam penagas air;
 - hilangkan warna dengan menambahkan sedikit NaHSO_3 kering;
 - tambahkan 1 mL asam kromatropat
 - tambahkan 15 mL H_2SO_4 perlahan-lahan dengan pengadukan dan tempatkan pada penangas air (60°C - 75°C) selama 15 menit;
 - dinginkan, tambahkan dengan H_2O hingga mendekatis garis tanda 50 mL, kocok, dan tempatkan volumenya hingga 50 mL pada suhu ruang;
 - baca absorbansi pada panjang gelombang 575 nm dengan menggunakan blanko alkohol 5,5 % yang diperlakukan sama seperti contoh uji; dan
 - perlakukan larutan standar metanol 0,025 % dalam 5,5 % alkohol dengan perlakuan sama dan baca absorbansinya

A.5.5 Perhitungan

$$\text{Kadar metanol (\% v/v)} = \frac{\text{Absorbansi contoh uji}}{\text{Absorbansi standar}} \times 0,025 \times \text{faktor pengenceran}$$

A.6 Kepahitan (*bitterness*)

A.6.1 Prinsip

Ekstraksi contoh menggunakan isooktana dalam suasana asam. Zat pahit (*bitterstof*) diukur menggunakan alat spektrofotometer UV pada panjang gelombang 275 nm.

A.6.2 Peralatan

- Spektrofotometer UV terkalibrasi;
- Shaker* ;
- Tabung sentrifusa;
- Pipet volumetrik berukuran 1 mL dan 20 mL terkalibrasi dengan ketelitian 0,01 mL

A.6.3 Perekasi

- Isooktana;
- Asam klorida, HCl 3 N

A.6.4 Cara kerja

- Hilangkan CO₂ pada bir hitam dengan cara menuangkan secara bergantian dari satu wadah ke wadah yang lain sampai tidak ada lagi gelembung;
- masukkan contoh bir hitam sebanyak 10 mL ke dalam tabung sentrifusa;
- tambahkan 1 mL HCl 3 N dan 20 mL isooktana;
- tabung sentrifusa ditutup dan dikocok selama 15 menit menggunakan *shaker*;
- diamkan selama 10 menit agar campuran terpisah;
- ambil lapisan atas yang jernih dan masukkan ke dalam kuvet; dan
- ukur absorbansi pada panjang gelombang 275 nm

A.6.5 Perhitungan

Kepahitan (*Bitterness Unit*) : absorben x 50

A.7 CO₂

A.7.1 Prinsip

Kandungan CO₂ dalam bir dapat diketahui dengan mengukur tekanan menggunakan manometer.

A.7.2 Peralatan

- Manometer;
- Tabel konversi CO₂

A.7.3 Cara kerja

- Angkat manometer sehingga berada di bagian atas peyangga;
- letakkan bir diantara kedua penyangga manometer, pastikan bir berada tepat di bawah pipa manometer;
- kran manometer dalam keadaan tertutup
- tekan atau tusukkan pipa manometer, kemudain buka kran manometer;
- baca skala yang ditunjukkan dalam kg/cm^2 ; dan
- konversikan dengan tabel untuk mengetahui tekanan CO_2 dalam % b/b, dengan memperhatikan suhu pada saat penetapan.

A.8 Sari (ekstrak asal)

A.8.1 Prinsip

Residu dari penetapan etanol, ditambah air suling sampai 100 mL dan ditetapkan berat jenisnya pada 15 °C. Kadar ekstrak diketahui/dicari dengan bantuan Tabel A.2. Selanjutnya kadar sari (ekstrak asal) dapat dihitung.

A.8.2 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Piknometer;
- Pendingin tegak;
- Labu destilasi;
- Penangas listrik.

A.8.3 Pereaksi

- Air suling

A.8.4 Cara kerja

A.8.4.1 Penetapan kadar alkohol % b/b

- Distilasi 50 g bir hitam bebas CO_2 , destilat langsung ditampung dalam piknometer;
- lakukan pekerjaan seperti pada penetapan kadar alkohol. Kadar alkohol % v/v dapat diketahui
- cari kadar alkohol % b/b dengan bantuan Tabel A.2; dan
- kalikan harga yang terdapat di daftar dengan berat sulingan dan dibagi dengan berat contoh

A.8.4.2 Kadar ekstrak

- Tambahkan air suling ke dalam residu dari penetapan kadar etanol sampai 100 mL;
- tetapkan berat jenisnya pada 15 °C; dan
- cari kadar ekstrak dengan bantuan Tabel A.3.

A.8.5 Perhitungan

Kadar sari (ekstrak asal) dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar sari (ekstrak asal)} = ((P \times 2,0665) + E) \times \frac{100}{100 + (P \times 1,0665)}$$

Keterangan :

P = Kadar alkohol (% berat) menurut Tabel A.2

E = Kadar ekstrak menurut Tabel A.3

Tabel A.2 – Hubungan antara kadar alkohol (% berat) dan kadar alkohol (% isi) pada 15 °C

Kadar alkohol 15° C (% isi)	Kadar alkohol (berat)	Perbedaan	Kadar alkohol 15° C (% isi)	Kadar alkohol (berat)	Perbedaan
0	0,000	-	26	21,285	0,842
1	0,795	0,795	27	22,127	0,842
2	1,593	0,798	28	22,973	0,846
3	2,392	0,799	29	23,820	0,847
4	3,194	0,802	30	24,670	0,850
5	3,998	0,804	31	25,524	0,854
6	4,804	0,806	32	26,382	0,858
7	5,612	0,808	33	27,242	0,860
8	6,422	0,810	34	28,704	0,862
9	7,234	0,812	35	28,971	0,867
10	8,047	0,813	36	29,842	0,871
11	8,862	0,815	37	30,717	0,875
12	9,679	0,817	38	31,596	0,879
13	10,496	0,818	39	32,478	0,882
14	11,317	0,820	40	33,364	0,886
15	12,138	0,821	41	34,254	0,890
16	12,961	0,823	42	35,150	0,896
17	13,786	0,825	43	36,050	0,900
18	14,612	0,826	44	36,955	0,905
19	15,440	0,828	45	37,865	0,910
20	16,269	0,829	46	38,778	0,913
21	17,100	0,831	47	39,677	0,919
22	17,933	0,833	48	40,622	0,925
23	18,768	0,835	49	41,558	0,929
24	19,604	0,836	50	42,487	0,936
25	20,443	0,839			

Tabel A.3 – Hubungan antara berat jenis dan kadar sari (ekstrak)

Berat Jenis 15/15	Kadar Sari (%)	Interpolasi Faktor	Berat Jenis 15/15	Kadar Sari (%)	Interpolasi Faktor
1,0000	0	> 0,026	1,0270	6,81	> 0,024
1,0010	0,26		1,0280	7,06	
1,0020	0,52		1,0290	7,31	
1,0030	0,77		1,0300	7,55	
1,0040	1,03		1,0310	7,80	
1,0050	1,29		1,0320	8,04	
1,0060	1,54		1,0330	8,29	
1,0070	1,80		1,0340	8,53	
1,0080	2,05		1,0350	8,78	
1,0090	2,31		1,0360	9,02	
1,0100	2,56		1,0370	9,26	
1,0110	2,82		1,0380	9,50	
1,0120	3,07		1,0390	9,75	
1,0130	3,32		1,0400	9,99	
1,0140	3,57		1,0410	10,23	
1,0150	3,83	> 0,025	1,0420	10,47	
1,0160	4,08		1,0430	10,71	
1,0170	4,33		1,0440	10,95	
1,0180	4,58		1,0450	11,19	
1,0190	4,83		1,0460	11,42	
1,0200	5,08		1,0470	11,66	
1,0210	5,33		1,0480	11,90	
1,0220	5,58		1,0490	12,14	
1,0230	5,83		1,0500	12,32	
1,0240	6,07				
1,0250	6,52				
1,0260	6,57				

A.9 Cemarkan logam

A.9.1 Kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

A.9.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada suhu 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

A.9.1.2 Peralatan

- SSA beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Penangas air;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- Gelas ukur kapasitas 10 mL;
- Gelas piala 250 mL;
- Cawan porselin/platina/kwarsa dengan kapasitas 50 mL - 100 mL;

- k) Kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi *particle retention liquid* 20 μm - 25 μm .

A.9.1.3 Perekaksi

- a) Larutan asam nitrat, HNO_3 pekat (65%, Bj 1,4);
- b) Larutan asam klorida, HCl pekat (37%, Bj 1,19);
- c) Larutan asam nitrat, HNO_3 0,1 N;
encerkan 7 mL HNO_3 65% dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
- d) Larutan asam klorida, HCl 6 N;
encerkan 500 mL HCl 37% dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
- e) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
larutkan 1 000 g Cd dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1 000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- f) Larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
pipet 10 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- g) Larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
pipet 10 mL larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- h) Larutan baku kerja Cd;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,5 mL, 1 mL; 2 mL; 4 mL; 7 mL dan 9 mL larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,2 $\mu\text{g/mL}$; 0,4 $\mu\text{g/mL}$; 0,8 $\mu\text{g/mL}$; 1,4 $\mu\text{g/mL}$ dan 1,8 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- i) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Pb;
larutkan 1 000 g Pb dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1 000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- j) Larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ Pb; dan
pipet 5,0 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 $\mu\text{g/mL}$.
- k) Larutan baku kerja Pb;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,25 $\mu\text{g/mL}$; 0,5 $\mu\text{g/mL}$; 1,0 $\mu\text{g/mL}$; 1,5 $\mu\text{g/mL}$ dan 2,0 $\mu\text{g/mL}$ Pb.

A.9.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh dengan teliti dalam cawan porselin/ platina/ kuarsa (m);
- b) tempatkan cawan berisi contoh uji di atas penangas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi;
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur pada suhu $(450 \pm 5) ^\circ\text{C}$ sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;

- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO_3 pekat kira-kira 0,5 mL sampai dengan 3 mL;
- e) keringkan cawan di atas penangas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 450°C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO_3 pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO_3 0,1 N dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V)
- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- h) baca absorbansi larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- k) hitung kandungan logam dalam contoh.

A.9.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

C adalah kandungan logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrog per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL); dan
 m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam g (g).

A.9.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.9.2 Timah (Sn)

A.9.2.1 Prinsip

Contoh didekstruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian ditambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

A.9.2.2 Peralatan

- a) SSA beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C ;
- c) Penangas air;
- d) Pemanas listrik;
- e) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- f) Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- g) Pipet ukur berskala 10 mL kapasitas 5 mL dan 0,1 mL terkalibrasi;
- h) Erlenmeyer 250 mL;
- i) Gelas ukur kapasitas 50 mL; dan

- j) Gelas piala 250 mL.
- k) Kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi *particle retention liquid* 20 µm - 25 µm.

A.9.2.3 Pereaksi

- a) Larutan kalium klorida, 10 mg/mL K;
larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 mL.
- b) Asam nitrat pekat, HNO₃ pekat;
- c) Asam klorida pekat, HCl pekat;
- d) Larutan baku 1 000 µg/mL Sn; dan
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL asam HCl pekat dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) Larutan baku kerja Sn.
pipet 10 mL HCl pekat dan 1,0 mL larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1 000 µg/mL Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL; 15 µg/mL; 20 µg/mL dan 25 µg/mL Sn.

A.9.2.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g (m) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 mL, tambahkan 30 mL HNO₃ pekat dan biarkan 15 menit;
- b) panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- c) lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- d) angkat Erlenmeyer dari penangas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl₂ berhenti;
- e) tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- f) tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas Erlenmeyer tersebut dengan 10 mL air suling (V);
- g) tambahkan 1,0 mL KCl, dinginkan pada temperatur ruang, tera dengan air suling dan saring;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) baca absorban larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi N₂O-C₂H₂;
- j) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- k) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- l) lakukan pengerjaan duplo; dan
- m) hitung kandungan Sn dalam contoh;

A.9.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi timah (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrog per mililiter (µg/mL)
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam g (g).

A.9.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan timah (Sn). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.9.3 Merkuri (Hg)

A.9.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH_4 atau SnCl_2 dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorban Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm.

A.9.3.2 Peralatan

- SSA yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap dingin (*Cold Vapour*) terkalibrasi ;
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Penangas listrik;
- Pendingin;
- Labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, dan 100 mL terkalibrasi;
- Gelas ukur 25 mL; dan
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;

A.9.3.3 Pereaksi

- Air suling;
- Asam sulfat, H_2SO_4 9 M;
- Asam nitrat, HNO_3 7 M;
- Batu didih;
- Campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1);
- Hidrogen peroksida, H_2O_2 ;
- Larutan natrium molibdat 2 %.
- Larutan pereduksi;
campurkan 50 mL H_2SO_4 dengan 300 mL air suling dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan kedalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan NaBH_4 ;
larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 mL.
- Larutan pengencer;
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL air suling kedalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL HNO_3 kemudian 67 mL H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg;
larutkan 0,135 4 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 mL air suling dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ Hg; dan
Pipet 1 mL larutan baku 1 000 mg/l Hg ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 mg/l.

m) Larutan baku kerja Hg;

Pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1 mg/l ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,002 5 µg/mL; 0,005 µg/mL; 0,01 µg/mL; 0,02 µg/mL Hg.

A.9.3.4 Cara kerja**A.9.3.4.1 Pengabuan basah**

- Timbang 5 g contoh (m) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL H_2SO_4 9 M, 20 mL HNO_3 7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2 %, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas penangas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- tambahkan 20 mL campuran $\text{HNO}_3 - \text{HClO}_4$ (1:1) melalui pendingin;
- hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- tambahkan 10 mL air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- didihkan lagi selama 10 menit;
- matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko;
- baca absorbansi larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.9.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- Timbang 0,5 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko;
- baca absorbansi larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;

- h) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- i) lakukan pengerjaan duplo; dan
- j) hitung kandungan Hg dalam contoh;

A.9.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi merkuri (Hg) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrog per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam g (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

A.9.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan merkuri (Hg). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.10 Cemarkan arsen (As)

A.10.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan NaBH_4 atau SnCl_2 sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimum 193,7 nm.

A.10.2 Peralatan

- a) SSA yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida ("HVG");
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- c) *Microwave digester* ;
- d) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- e) Labu Kjeldahl;
- f) Pemanas listrik;
- g) Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- h) Pipet volumetrik berukuran 25 mL terkalibrasi;
- i) Cawan porselen kapasitas 50 mL;
- j) Gelas ukur 25 mL;
- k) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi; dan
- l) Labu borosilikat berdasar bulat 50 mL.

A.10.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- b) Asam perklorat, HClO_4 pekat;
- c) Natrium boronhidrida, NaBH_4 4 %;
larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 mL.
- d) Asam klorida, HCl 8 M;
larutkan 66 mL HCl 37 % kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.

- e) Timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 %;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam piala gelas 200 mL dan tambahkan 100 mL HCl 37 %. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- f) Kalium iodida, KI 20 %;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- g) Larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/mL;
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 mL H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 mL HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan air suling;
- h) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ As;
larutkan 1,3203 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20 % dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) Larutan baku 100 $\mu\text{g/mL}$ As;
pipet 10 mL larutan baku arsen 1 000 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ As.
- j) Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As; dan
pipet 1 mL larutan standar arsen 100 mg/l ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$ As.
- k) Larutan baku kerja As;
pipet masing-masing 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,05 $\mu\text{g/mL}$ As.

A.10.4 Cara kerja

A.10.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai 10 g contoh (m) ke dalam labu Kjeldahl 250 mL, tambahkan 5 mL sampai 10 mL HNO_3 pekat dan 4 mL sampai 8 mL H_2SO_4 pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO_3 pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 2 mL HClO_4 70 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan asam perklorat, tambahkan lagi sedikit HNO_3 pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 mL H_2O dan 5 mL amonim oksalat jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap SO_3 di leher labu;
- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- g) pipet 25 mL larutan diatas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi (NaBH_4) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko;
- j) baca absorbansi larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);

- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh.

A.10.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 0,5 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO₃, 1 mL H₂O₂ kemudian tutup rapat.
- b) masukkan ke dalam oven *microwave* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) pipet 10 mL larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan Mg(NO₃)₂, Uapkan di atas penangas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu 450 °C (± 1 jam);
- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20 % dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan NaBH₄ dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01 µg/mL; 0,02 µg/mL; 0,03 µg/mL; 0,04 µg/mL; 0,05 µg/mL serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan burner serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbansi tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

A.10.4.3 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi arsen (As) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrog per mililiter (µg/mL)
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam g (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

A.10.4.4 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan arsen (As). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.11 Cemarkan mikroba

A.11.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka Lempeng Total, Bakteri *Coliform*, dan *Staphylococcus aureus*

A.11.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel minuman dan untuk menggiatkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi

yang kurang menguntungkan dalam minuman. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh minuman yang ditetapkan.

A.11.1.2 Peralatan

- Alat homogenisasi yang sesuai (blender) dengan kecepatan putaran 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- Otoklaf;
- Penangas listrik;
- Neraca kapasitas 2 000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas piala steril;
- Labu Erlenmeyer steril;
- Botol pengencer steril;
- Pipet volumetrik steril berukuran 1,0 dan 10,0 mL terkalibrasi ;
- Tabung reaksi; dan

A.11.1.3 Larutan Pengencer

Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);

- | | |
|----------------------------|--------|
| - KH_2PO_4 | 34 g |
| - Air suling | 500 mL |

Larutkan bahan-bahan di atas dan atur pH dengan NaOH sehingga mencapai pH 7,2, tepatkan volume sampai 1 000 mL dengan akuabides. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit, simpan pada refrigerator. Untuk membuat larutan pengencer, 1,25 mL larutan stok diencerkan dengan air suling sampai volume 1 000 mL. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam botol pengencer sebanyak 450 mL dan ke dalam tabung reaksi sebanyak 9 mL dan disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.11.1.4 Homogenisasi contoh

- Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pengencer sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.11.2 Angka lempeng total

A.11.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama (48 ± 2) jam pada suhu (35 ± 1) °C.

A.11.2.2 Peralatan

- Inkubator (35 ± 1) °C terkalibrasi;
- Otoklaf;
- Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- Alat penghitung koloni (*colony counter*);
- Penangas air bersirkulasi (45 ± 1) °C;
- Cawan Petri gelas/plastik steril (berdiameter 50 mm sampai dengan 60 mm);
- Pipet volumetrik berukuran 10 mL, 5 mL, dan 1 mL steril terkalibrasi

A.11.2.3 Pembenihan dan pengencer

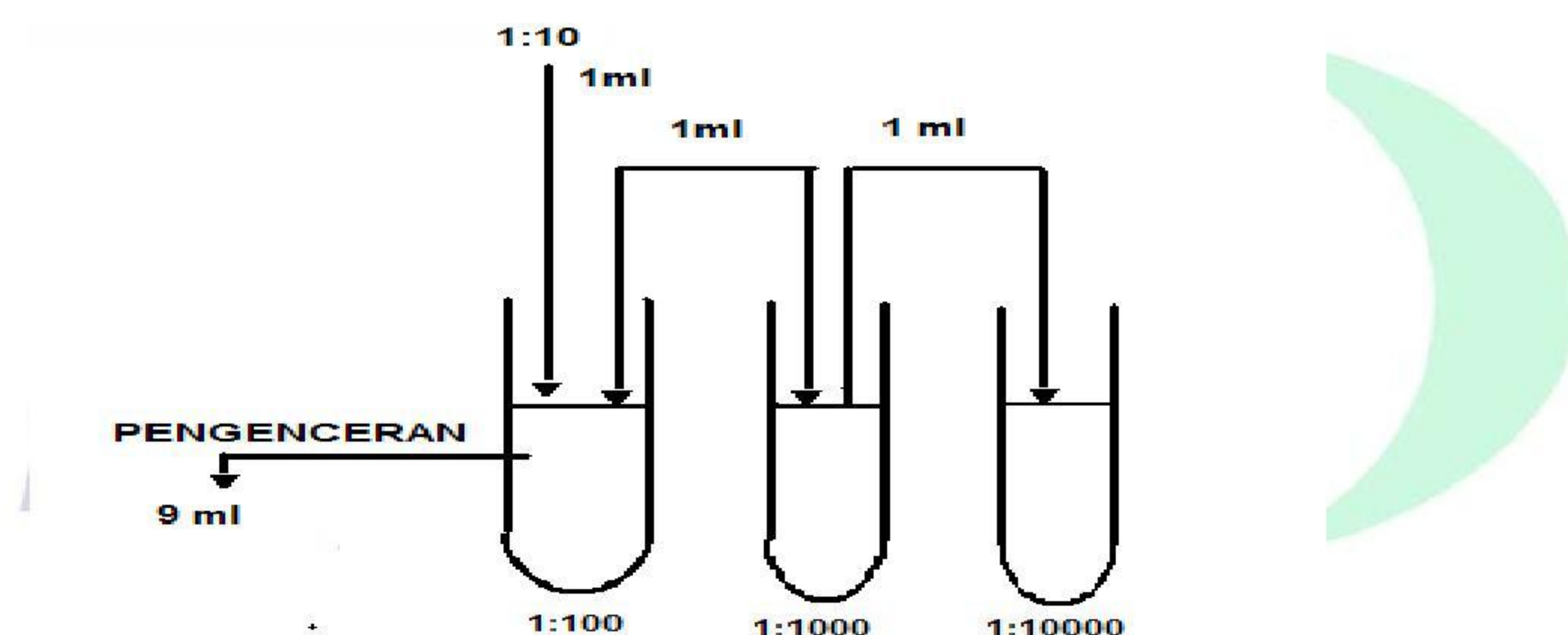
Plate Count Agar (PCA)

– Tryptone	5 g
– Yeast extract	2,5 g
– Glukosa	1 g
– Agar	15 g
– Air suling	1 000 mL

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.11.2.4 Cara kerja

- Buat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan seperti pada Gambar A.1 dengan menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water* (BPB);
- pipet masing-masing 1 mL dari tingkat pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-4} ke dalam cawan Petri steril secara duplo;



Gambar A.1 – Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate -Buffered Dilution Water* (BPB)

- tuangkan 12 mL sampai dengan 15 mL media PCA yang masih cair dengan suhu $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ke dalam masing-masing cawan Petri;
- goyangkan cawan Petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata dan memadat;
- kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;
- biarkan sampai campuran dalam cawan Petri memadat;
- masukkan semua cawan Petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering pada suhu $36 ^\circ\text{C}$ selama (48 ± 2) jam; dan
- catat pertumbuhan koloni (n) pada setiap cawan Petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni setelah 48 jam.

A.11.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/mL) = $n \times F$

Keterangan:

- n adalah rata - rata koloni dari dua cawan Petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per mililiter (koloni/mL);
 F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

A.11.2.5 Pernyataan hasil**A.11.2.5.1 Cara menghitung**

- a) Pilih cawan Petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan Petri. Hitung semua koloni dalam cawan Petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per mililiter;
 b) jika salah satu dari dua cawan Petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per mililiter;

Contoh :

$\frac{10^{-2}}{120}$	$\frac{10^{-3}}{25}$
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing koloni per mililiter dengan rumus :

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

Keterangan:

- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap Petri;
 n_1 adalah jumlah Petri dari pengenceran pertama yang dihitung;
 n_2 adalah jumlah Petri dari pengenceran kedua;
 d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

$\frac{10^{-2}}{131}$	$\frac{10^{-3}}{30}$
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing Petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
 – jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640\ 000\ (6,4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya:
area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6\ 500\ 000\ (6,5 \times 10^6)$
~	6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5\ 900\ 000\ (5,9 \times 10^6)$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan Petri kurang dari 25 koloni, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
- f) menghitung koloni perambat;
Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :
- merupakan rantai yang tidak terpisah;
 - perambat yang terjadi diantara dasar cawan Petri dan pembenihan; dan
 - perambatan yang terjadi pada pinggir atau penukaran pembenihan.
- Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk satu atau lebih rantai terbentuk dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.

A.11.2.5.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut
 - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

A.11.3 Bakteri *Coliform* dan *Escherichia coli*

A.11.3.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Coliform* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung Durham, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

A.11.3.2 Peralatan

- Inkubator (35 ± 1) °C, terkalibrasi;
- Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, ($45,5 \pm 0,2$) °C;
- Rak untuk tabung reaksi;
- Pipet ukur 10 mL dan 1 mL steril berskala;
- Botol pengencer terbuat dari gelas borosilikat, dengan tutup ulir plastik;
- Tabung reaksi
- Tabung *Durham*;
- Cawan Petri gelas/plastik steril (ukuran 15 mm x 100 mm atau 15 mm x 90 mm); dan
- Jarum Ose, dengan diameter dalam kira-kira 3 mm.

A.6.3.3 Perbenihan pengencer dan pereaksi

- a) *Lauryl sulfate tryptose (LST) broth / Lauryl tryptose (LT) broth*;
- b) *Brilliant green lactose bile (BGLB) broth 2 %*;
- c) *Escherichia coli (EC) broth*;
- d) *Levine's eosin methylene blue (L-EMB) agar*;
- e) *Plate count agar (PCA)*;
- f) *G stain*;
- g) *Tryptone (tryptophane) broth*;
- h) *Pereaksi kovacs'*;
- i) *Merah metil – voges proskauer (MR – VP) broth*;
- j) *Pereaksi voges proskauer*;
- k) *Larutan merah metil*;
- l) *Koser's citrate broth*;
- m) *Peptone diluents 0,1 %*;
- n) *Pereaksi indol*;
- o) *Larutan kalium hidroksida 40 %*;
- p) *Buffer fields phosfat buffered dilution water*;
- q) *Larutan alpha naphthol 5%*; dan
- r) *Kristal kreatin*.

A.11.3.4 Cara kerja

A.11.3.4.1 APM - Uji pendugaan untuk bakteri *Coliform*

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada A.11.1;
- b) inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *Lauryl sulfate tryptose (LST) broth* yang di dalamnya terdapat tabung Durham terbalik. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- c) masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu 35°C selama (48 ± 2) jam;
- d) amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- (24 ± 2) . Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- e) tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- f) catat adanya pembentukan gas setelah inkubasi (48 ± 2) jam, dan nyatakan tabung tersebut "positif"; dan
- g) lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif untuk uji pendugaan.

A.11.3.4.2 APM - Uji penegasan untuk bakteri *Coliform*

- a) Kocok tabung *LST broth* yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- b) pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung *LST broth* yang positif ke dalam tabung *BGLB broth 2 %* yang berlainan;
- c) masukkan tabung-tabung *BGLB broth 2 %* ke dalam inkubator pada suhu 35°C selama (48 ± 2) jam;
- d) catat semua tabung *BGLB broth* yang positif menghasilkan gas dan dengan menggunakan Tabel A.4, tentukan APM berdasarkan jumlah tabung *BGLB broth* yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama (48 ± 2) jam pada 35°C ; dan
- e) laporkan sebagai APM bakteri *Coliform* per g.

Tabel A.4 – APM per 100 mL contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap pengenceran 10/ 100 mL, 1,0/ 100 mL, dan 0,1 mL/ 100 mL

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	2	0	29
0	2	0	6	2	2	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	>1100

A.11.4 *Salmonella* sp

A.11.4.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan konfirmasi melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella* sp.

A.11.4.2 Peralatan

- Inkubator, $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$;
- Inkubator *refrigerated* atau *laboratory refrigerator*, $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$
- Otoklaf;
- Oven;
- Penangas air, $(49 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- Penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled*, $(42 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$;
- Neraca, kapasitas 2 000 g, dengan ketelitian 0,1 g;
- Neraca, kapasitas 120 g, dengan ketelitian 5 mg;

- i) Blender (10 000 rpm - 12 000 rpm) dan blender jar steril;
- j) Botol bertutup ulir bermulut lebar (500 mL) steril, labu Erlenmeyer 500 mL steril, *beaker* 250 mL steril, *sterile glass* atau *paper funnels* dengan ukuran sesuai, dan pilihan lain, kontainer dengan kapasitas sesuai untuk mengakomodasi contoh komposit;
- k) *Bent glass* atau batang penyebar plastik steril;
- l) Sendok steril, atau peralatan lain untuk memindahkan contoh makanan;
- m) Cawan Petri steril, 15 mm x 100 mm, kaca atau plastik;
- n) Pipet steril, 1 mL dengan ketelitian 0,01 mL; dan pipet steril 10 mL dan 5 mL dengan ketelitian 0,1 mL;
- o) Jarum Ose (diameter \pm 3 mm), *nichrome*, *platinum-iridium chromel wire* atau plastik steril;
- p) Tabung reaksi atau tabung kultur steril, 10 mm x 150 mm dan 20 x 150 mm; tabung serologikal, 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm;
- q) Botol pengencer 1 000 mL;
- r) Rak tabung reaksi atau rak tabung kultur;
- s) Vorteks;
- t) Lampu (untuk mengamati reaksi serologi);
- u) *Bunsen*;
- v) Kertas pH (kisaran pH 6-8) dengan ketelitian maksimum 0,4 unit pH per perubahan warna;
- w) pH meter;

A.11.4.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) *Lactose broth*;
- b) *Tetrathionate (TT) broth*;
- c) *Rappaport-Vassiliadis (RV) medium* (*RV medium* harus dibuat dari bahan-bahan yang terdapat dalam komposisi *RV medium* tersebut. Formulasi yang tersedia secara komersial tidak dapat diterima);
- d) *Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar*;
- e) *Hektoen enteric (HE) agar*;
- f) *Bismuth sulfite (BS) agar*;
- g) *Triple sugar iron (TSI) agar*;
- h) *Tryptone (tryptophane) broth*;
- i) *Trypticase (tryptic) soy broth*;
- j) *Trypticase soy broth* dengan *ferrous sulfate*;
- k) *Trypticase soy-tryptose broth*;
- l) Merah metil-Voges Proskeaur (MR-VP) *broth*
- m) *Simmons citrate agar*;
- n) *Urea broth*;
- o) *Urea broth (rapid)*;
- p) *Malonate broth*;
- q) *Lysine iron agar (LIA)* (Edward dan Fife)
- r) *Lysine decarboxylase broth*;
- s) Medium uji motilitas (semi padat);
- t) Kalium sianida (KCN) *broth*;
- u) *Phenol red carbohydrate broth*;
- v) *Purple carbohydrate broth*;
- w) *MacConkey agar*;
- x) *Nutrient broth*;
- y) *Brain heart infusion (BHI) broth*;
- z) Larutan papain, 5 %;
- aa) Larutan selulosa, 1 %;
- bb) *Tryptose blood agar base*;
- cc) Bubuk kalium sulfit, anhidrat;
- dd) Larutan *chlorine*, 200 ppm, mengandung 0,1 % *sodium dodecyl sulfate*;

- ee) Etanol, 70 %;
- ff) Pereaksi Kovacs'
- gg) Pereaksi uji Voges-Proskauer (VP)
- hh) Kristal *creatine phosphate*
- ii) Larutan kalium hidroksida, 40 %
- jj) Larutan natrium hidroksida 1 N
- kk) Asam hidroklorat 1 N
- ll) Larutan *brilliant green dye*, 1 %
- mm) Larutan *bromcresol purple dye*, 0,2 %
- nn) Indikator merah metil
- oo) Air suling steril
- pp) Larutan *physiological saline*, 0,85 % (steril)
- qq) Larutan *formalinized physiological saline*
- rr) *Salmonella polyvalent somatic (O) antiserum*
- ss) *Salmonella polyvalent flagellar (H) antiserum*
- tt) *Salmonella somatic group (O) antisera*: A, B, C₁, C₂, C₃, D₁, D₂, E₁, E₂, E₃, E₄, F, G, H, I, Vi, atau kelompok lain yang sesuai
- uu) *Salmonella* Spicer-Edwards *flagellar (H) antisera*

A.11.4.4 Cara Kerja

A.11.4.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Pipet 25 mL contoh ke dalam blender yang steril dan tambahkan 225 mL *trypticase soy broth* steril. Kocok selama 2 menit;
- b) pindahkan secara aseptik ke dalam botol pengencer 500 mL dan biarkan pada suhu ruang selama (60 ± 5) menit dengan wadah tertutup, kemudian kocok perlahan;
- c) tambahkan 0,45 mL larutan *Brilliant green dye* 1 %, kocok hingga tercampur merata; dan
- d) kendurkan tutup wadah secukupnya $\frac{1}{4}$ putaran. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada 35 °C.

A.11.4.4.2 Pengkayaan (*enrichment*)

- a) Kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang telah selesai diinkubasi;
- b) pipet 0,1 mL biakan pra-pengkayaan kedalam 10 mL media *Rappaport-Vassiliadis (RV)* dan 1 mL biakan pra-pengkayaan lainnya ke dalam 10 mL *tetrathionate (TT) broth* dan vortex masing-masing campuran tersebut; dan
- c) inkubasikan media RV pada suhu $(42 \pm 0,2)$ °C selama (24 ± 2) jam dan TT *broth* pada $(35 \pm 2,0)$ °C selama (24 ± 2) jam dalam penangas air bersirkulasi.

A.11.4.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif

- a) Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum Ose, goreskan sepanjang 3 mm biakan pengkayaan TT *broth* ke dalam cawan Petri yang berisi media XLD, HE dan BS agar. Siapkan BS agar sehari sebelum digunakan dan simpan di tempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores.
- b) ulangi cara di atas dari media pengkayaan RV;
- c) inkubasikan cawan-cawan BS, HE dan XLD selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C;
- d) amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella sp*;
Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:
Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella sp* dari masing-masing media agar selektif setelah (24 ± 2) jam inkubasi. Koloni-koloni *Salmonella sp* adalah sebagai berikut:

- XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella sp* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.
- HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella sp* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.
- BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam. Jika masa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.
- e) jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BS setelah inkubasi (24 ± 2) jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama (24 ± 2) jam. Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BS setelah inkubasi (48 ± 2) jam, ambil 2 atau lebih koloni yang tidak khas;
- f) dengan menggunakan jarum inokulasi steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan kedalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menginokulasikan media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dahulu, setelah itu goreskan pada agar miring. Karena reaksi *Lysine decarboxylase* sangat anaerobik, LIA miring harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloni pada suhu (5 - 8) °C;
- g) inkubasi TSI dan LIA pada suhu 35 °C selama (24 ± 2) jam dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya H₂S yang berlebihan. Pada TSI, kultur *Salmonella sp.* yang khas memberikan reaksi alkalin (merah) pada bagian miring dan asam (kuning) pada tusukan, dengan atau tanpa H₂S (warna kehitaman pada agar). Pada LIA kultur *Salmonella sp* yang khas memberikan reaksi alkalin (ungu) pada keseluruhan tabung. Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai kultur negatif. Jangan hanya melihat perubahan warna pada tusukan untuk menyatakan kultur negatif. Umumnya kultur *Salmonella sp* membentuk H₂S pada agar miring LIA; Beberapa kultur non *Salmonella sp* membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA;
- h) semua biakan yang memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan didalam media LIA tanpa memperhatikan reaksi TSI akan potensial sebagai *Salmonella sp. sp.* dan dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan pada media LIA dan alkalin pada bagian miringnya dan reaksi asam pada tusukan di TSI harus dipertimbangkan juga sebagai potensial *Salmonella sp* dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan di media LIA dan asam pada bagian miringnya, dan reaksi asam pada tusukannya di media TSI dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella sp.* Bila kultur TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella sp* (alkalin pada goresan dan asam pada tusukan), ulangi lagi pengujian dengan mengambil koloni yang mencurigakan dari medium selektif yang tidak memberikan kultur duga positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA seperti cara mulai pasal f di atas; dan
- i) lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap:
- tiga kultur presumtif TSI dari 1 set media selektif (HE, XLD dan BS) yang diinokulasi dari TTB, dan tiga kultur presumtif yang diinokulasikan dari RV;
 - jika tiga kultur presumtif positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media selektif, uji presumtif positif TSI dari media agar yang lain. Uji sedikitnya 6 kultur TSI untuk setiap 100 mL contoh minuman.

A.11.4.5 Identifikasi *Salmonella sp*

A.11.4.5.1 Kultur campuran

- a) Apabila kultur TSI agar terlihat tercampur, maka goreskan kembali ke dalam media *MacConkey agar*, *HE agar* atau *XLD broth*. Inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C . Amati koloni yang diduga *Salmonella sp* :
 - *Mac Conkey agar*. Koloni yang khas tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella sp* akan membentuk area yang terang dari pengendapan *bile* disebabkan oleh bakteri lain yang muncul atau tumbuh;
 - *hektoen enteric* (HE) agar. Koloni-koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella sp* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam;
 - *xylose lysine desoxycholate* (XLD) agar. Koloni merah muda dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella sp* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.
- b) pindahkan sedikitnya 2 koloni terduga *Salmonella sp* pada media TSI dan LIA seperti pada pasal A.11.4.4.3.f dan lanjutkan seperti pada pasal A.11.4.4.3.g.

A.11.4.5.2 Kultur murni

- a) Uji urease (konvensional); dan
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella sp* dengan jarum inokulasi ke dalam *urea broth*. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C ; dan
- b) uji urease (cepat).
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella sp* dengan jarum inokulasi ke dalam *rapid urea Broth*. Inokulasikan 2 jam dalam penangas air pada suhu $(37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$. Reaksi *Salmonella sp* yang khas untuk uji urease memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna).

A.11.4.5.3 Pengujian kultur urease negatif

- a) *Lysine decarboxylase* (LD) *broth*;
Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Ambil 1 ose dari TSI dan inokulasikan kedalam media LDB. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. *Salmonella sp* memberikan reaksi alkalin ditandai dengan warna ungu pada seluruh media. Reaksi negatif ditunjukkan dengan warna kuning pada seluruh media. Jika hasil reaksi tidak menunjukkan warna kuning atau ungu tambahkan beberapa tetes 0,2 % *bromocresol purple dye* dan amati perubahan warnanya.
- b) *Phenol red dulcitol* atau *purple broth base* dengan 0,5 % *dulcitol*; dan
inokulasi media *dulcitol broth* dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C yang amati setelah 24 jam. Pada umumnya *Salmonella sp* memberikan hasil positif yang ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung Durham dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung Durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.
- c) *Tryptone (tryptophane) broth* (TB);
Inokulasi media *tryptone broth* dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 35°C dan selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini:
 - *Potassium cyanida* (KCN) *broth*
Pindahkan 1 sengkeli biakan dari TB 24 jam kedalam media KCN *broth*. Tutup tabung rapat-rapat dan lapiasi dengan kertas parafilm. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya

pertumbuhan (ditandai dengan adanya kekeruhan). Umumnya *Salmonella* sp tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai dengan tidak terjadinya kekeruhan.

- *malonate broth*

Pindahkan 1 sengkeli dari biakan TB kedalam media *Malonate broth*. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang tabung *Malonate broth* yang tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan *Malonate broth* sebagai kontrol. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya *Salmonella* sp memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada *broth* ini.

- uji indol

Dari media TB yang tersisa pindahkan 5 mL kultur ke dalam tabung reaksi steril, tambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi *Kovacs'*. Amati segera setelah penambahan pereaksi. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella* sp memberikan reaksi negatif (tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai positif.

Nyatakan kultur sebagai bukan *Salmonella* sp bila reaksi indol positif dan *flagellar* (H) negatif, atau KCN positif dan LDB negatif;

A.11.4.5.4 Uji serologi *polyvalent flagellar* (H)

a) Inokulasi dari masing-masing TSI agar yang memberikan reaksi urease negatif kedalam:

- BHI *broth*, dan inkubasi selama 4 jam sampai dengan 6 jam pada suhu 35°C sampai terlihat pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama); atau
- *trypticase soy trypticase* (TST) *broth* dan inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C (untuk diuji hari berikutnya). Tambahkan 2,5 mL larutan *formanilized physiological saline* ke dalam 5 mL kultur di atas.

b) siapkan 2 kultur dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah diberi *formanilized physiological saline* dan uji dengan *Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera. Masukkan $\pm 0,5$ mL larutan *saline Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera dalam tabung serologi 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm. Tambahkan 0,5 mL antigen yang akan diuji. Siapkan kontrol *saline* dengan mencampur 0,5 mL *formanilized physiological saline* dengan 0,5 mL *formanilized* antigen. Inkubasikan campuran tersebut dalam penangas air pada suhu 48°C sampai dengan 50°C . Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam.

- Positif apabila terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol;
- negatif apabila tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan dalam kontrol; dan
- non spesifik terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan kontrol.

A.11.4.5.5 Uji serologi *polyvalent somatic* (o)

- a) Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan Petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- b) emulsikan biakan dari TSI miring umur 24 jam sampai dengan 48 jam dengan 2 mL 0,85 % *saline* menggunakan jarum Ose (dapat juga menggunakan biakan dari *tryptose blood agar base* tanpa darah);
- c) tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- d) tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes *polyvalent somatic* (o) *antiserum* ke dalam bagian yang lain;
- e) campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan

- f) klasifikasi uji *polyvalent somatic* (o) menunjukkan hasil sebagai berikut:
- Positif : terjadi penggumpalan di dalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;
 - negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*;
 - non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

A.11.4.5.6 Uji biokimia tambahan

Nyatakan sebagai *Salmonella* sp., kultur yang memberikan reaksi yang khas seperti pada Tabel A.5 butir 1-11. Jika 1 kultur TSI dari setiap 100 mL contoh menunjukkan *Salmonella* sp, uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Kultur yang memberikan reaksi positif pada uji serologi *flagellar* (H) tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella* sp. pada uji biokimia, harus dimurnikan seperti pada pasal A.11.4.5.1 diatas dan uji kembali pada pasal A.11.4.5.2 Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap kultur yang tidak memberikan reaksi yang khas seperti Tabel A.5 :

- a) *Phenol red lactose* atau *purple lactose broth*;
- Inokulasi broth ini dengan kultur TSI agar miring yang telah diinkubasi selama 24 jam sampai 48 jam. Inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam;
 - nyatakan positif, apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung Durham. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella* sp memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung Durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media;
 - jika kultur memberikan reaksi *lactose* positif, maka nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif pada LIA atau reaksi positif pada *malonate broth*.
- b) *Phenol red sucrose* atau *purple sucrose broth*;
- Ikuti prosedur seperti pada pasal A.6.4.5.6.a. Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp pada kultur yang memberikan reaksi positif uji sukrosa, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif (alkalin) pada LIA;
- c) Merah metil-Voges-Proskauer (MR-VP) *broth*;
- Inokulasi medium dengan sedikit biakan TSI agar miring dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
- Lakukan uji *Voges-Proskauer* (VP) pada suhu ruang sebagai berikut :
- Pindahkan 1 mL MR-VP *broth* yang telah diinkubasi selama (48 ± 2) jam kedalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali MR-VP *broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - Tambahkan 0,6 mL *alpha naphthol* dan aduk;
 - Tambahkan 0,2 mL larutan KOH 40 % dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin dan amati hasilnya setelah 4 jam; dan
 - Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi VP negatif.
- Uji merah metil (MR)
- Tambahkan 5 tetes sampai dengan 6 tetes indikator merah metil ke dalam 5 mL media MR-VP yang telah diinkubasi selama 96 jam;
 - amati hasilnya dengan segera; dan
 - umumnya *Salmonella* sp memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya wana kuning menunjukkan reaksi negatif.
- Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp kultur yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif.

d) *Simmons citrate agar*.

- Inokulasi medium dengan menggunakan jarum yang mengandung biakan dari TSI agar miring, dengan cara menggores agar miring dan menusuk bagian tegak. Inkubasikan selama (96 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
- nyatakan positif apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dari hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella sp* memberikan hasil sitrat positif;
- negatif apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.

A.11.4.5.7 Pernyataan hasil

Laporkan sebagai *Salmonella sp* kultur-kultur yang mempunyai reaksi seperti pada Tabel A.5. Laporkan sebagai bukan *Salmonella sp* kultur-kultur yang memberikan reaksi seperti pada Tabel A.6. Bila tidak ada 1 kultur TSI yang menunjukkan reaksi *Salmonella sp* pada uji biokimia, lakukan uji biokimia mulai dari pasal A.11.4.5.3 terhadap kultur yang memberikan reaksi urease negatif dari contoh yang sama.

Tabel A.5 – Reaksi biokimia dan serologi untuk *Salmonella sp*

No.	Substrat uji	Hasil reaksi		<i>Salmonella sp</i> reaksi species ^a
		Positif	Negatif	
1.	Glukosa (TSI)	tusukan kuning	tusukan merah	+
2.	<i>Lysine decarboxylase</i> (LIA)	tusukan ungu	tusukan kuning	+
3.	H ₂ S (TSI dan LIA)	Hitam	tidak hitam	+
4.	Urease	warna ungu sampai merah	tidak ada perubahan warna	-
5.	<i>Lysine decarboxy broth</i>	warna ungu	warna kuning	+
6.	<i>Phenol red dulcitol broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tanpa/ tidak berbentuk gas, tidak berubah warna	+ ^b
7.	KCN broth	pertumbuhan	tidak ada pertumbuhan	-
8.	<i>Malonate broth</i>	warna biru	tidak berubah warna	- ^c
9.	Uji indol	permukaan bewarna nila	permukaan bewarna kuning	-
10.	Uji <i>Polyvalent flagellar</i>	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
11.	Uji <i>Polyvalent somatic</i>	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
12.	<i>Phenol red lactose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	- ^c
13.	<i>Phenol red sucrose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	-
14.	Uji <i>Voges-Proskauer</i>	merah muda sampai merah	tidak berubah warna	-
15.	Uji merah metil	merah menyebar	kuning menyebar	+
16.	<i>Simmons citrate</i>	pertumbuhan, warna biru	tidak ada pertumbuhan dan perubahan warna	V

CATATAN:
^a+ adalah 90 % atau lebih positif dalam satu atau dua hari;
 - adalah 90 % atau lebih negatif dalam satu atau dua hari;
 V adalah variabel;
^b adalah mayoritas dari kultur *Salmonella arizonae*: negatif;
^c adalah mayoritas dari kultur *Salmonella arizonae*: positif.

Tabel A.6 – Reaksi biokimia dan serologi untuk non *Salmonella* sp

No	Substrat uji	Hasil
1	<i>Urease</i>	positif (warna ungu-merah)
2	Uji indol dan <i>polivalent flagellar</i> (H) atau uji indol dan uji Spicer-Edwards <i>flagellar</i>	positif (permukaan warna nila) negatif (tidak ada penggumpalan) positif (permukaan warna nila) negatif (tidak ada penggumpalan)
3	<i>Lysine decarboxylase</i> dan KCN broth	positif (ada pertumbuhan) negatif (warna kuning)
4	<i>Phenol red lactose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) ^{a,b}
5	<i>Phenol red sucrose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) ^b
6	KCN broth, uji <i>Voges-Proskauer</i> , dan merah metil	positif (ada pertumbuhan) positif (warna merah muda sampai merah) negatif (warna kuning menyebar)
CATATAN: ^a adalah uji <i>malonate broth</i> lebih lanjut pada biakan yang positif untuk menentukan <i>Salmonella arizonae</i> ^b adalah jangan dibuang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan <i>Salmonella</i> sp, uji lebih lanjut untuk mengamati apakah spesies tersebut <i>Salmonella</i> sp.		

A.11.5 *Staphylococcus aureus*

A.11.5.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada pembenihan khusus setelah diinkubasi pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam dan dilanjutkan dengan uji koagulase.

A.11.5.2 Peralatan

- Inkubator 35 °C;
- Oven;
- Spreader* steril dari gelas;
- Botol pengencer 500 mL;
- Tabung reaksi;
- Gelas ukur 10 mL dan 1 mL;
- Cawan Petri;
- Pipet ukur; dan
- Jarum Ose/inokulasi.

A.11.5.3 Perbenihan dan pereaksi

- Baird-parker* agar;
- Brain heart infusion broth* (BHIB); dan
- Plasma koagulase kelinci.

A.6.5.4 Cara kerja

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada A.11.1;
- pipet masing-masing 0,3 mL; 0,3 mL; 0,4 mL larutan contoh dari setiap seri pengenceran ke dalam masing-masing ke 3 cawan Petri yang berisi media BPA;
- sebar contoh secara merata dengan menggunakan *spreader* steril. Tahan cawan dalam posisi tegak lurus sampai contoh diserap oleh medium (\pm 10 menit). Jika contoh

tidak mudah terserap oleh medium, tempatkan cawan Petri pada posisi tegak lurus di dalam inkubator selama 1 jam sebelum cawan Petri dibalik;

- d) inkubasikan pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam; dan
- e) pilih cawan Petri yang mengandung 20 koloni sampai dengan 200 koloni dan hitung tersangka koloni *Staphylococcus aureus*, yaitu koloni berwarna abu-abu sampai hitam mengkilat dengan lingkaran cerah disekelilingnya dan seringkali lingkaran jernih, koloni mempunyai getah kental ketika disentuh dengan jarum Ose.

A.11.5.5 Uji koagulasi

- a) Pindahkan 5 koloni sampai dengan 10 koloni tersangka ke dalam tabung berisi 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB);
- b) inkubasikan pada suhu 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam;
- c) tambahkan koagulasi plasma kelinci sebanyak 0,5 mL ke dalam kultur BHIB dan campur;
- d) inkubasikan campuran plasma kelinci dengan biakan BHIB pada 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam dan memeriksanya, setelah 6 jam akan terbentuk penggumpalan. Hanya bentuk yang kokoh dan sempurna serta dapat bertahan di dalam wadahnya ketika tabung dibalikkan disebut sebagai positif *Staphylococcus aureus*;
- e) amati ada tidaknya koagulasi. Bila tidak terjadi koagulasi, lanjutkan inkubasi pada suhu kamar selama 24 jam, dan amati kembali ada tidaknya koagulasi;
- f) ratakan koloni (n) dari ketiga cawan Petri yang diwakili oleh koloni-koloni yang memberikan reaksi penggumpalan dan dikalikan dengan faktor pengenceranya; dan
- g) hitung jumlah *Staphylococcus aureus* dalam 1 g contoh.

A.11.5.6 Perhitungan

Angka *Staphylococcus aureus* (koloni/g) = $n \times F$

Keterangan:

- n adalah jumlah koloni, dinyatakan dalam koloni per g (koloni/g);
- F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

Bibliografi

- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 945.10, pH of Beer*, 18th Edition, Chapter 27.1.19
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 935.2, Alcohol (by Volume) in Beer*, 18th Edition, Chapter 27.1.10.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 984.14, Ethanol in Beer*, 18th Edition, Chapter 27.1.13.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 958.04, Methanol in Distilled Liquors*, 18th Edition, Chapter 26.1.34.
- American Society of Brewing Chemists. *Methods of Analysis*. 1992. Beer Bitterness. Beer 23.
- Association of Official Analytical Chemists. 2005. *AOAC Official Method 945.09, Extract of Beer*, 18th Edition, Chapter 27.1.08.
- American Society of Brewing Chemists. *Methods of Analysis*. 1992. Dissolved Carbon Dioxide. Beer 13-B.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18th Edition, Chapter 9.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 985.61, Tin in Canned Food, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.35.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2001. *Aerobic Plate Count*. Chapter 3.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2001. *Staphylococcus aureus*. Chapter 12.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2007. *Salmonella sp.* Chapter 5
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and The Coliform Bacteria*. Chapter 4.
- SNI 7387:2009, *Batas maksimum cemaran logam berat dalam pangan*.
- SNI 7388:2009, *Batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan*.